

IN VITRO I IN VIVO MIKRONUKLEUS METODE U GENOTOKSIKOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA

ALEKSANDRA FUČIĆ¹ I AUGUST MIJIĆ²

*Institut za medicinska istraživanja i
medicinu rada¹, Zagreb, Bolnica
»Sestre Milosrdnice«², Zagreb*

Primljeno svibanj 1999.

U današnje vrijeme životni i radni okoliš čovjeka nepredvidiva je mješavina kemijskih spojeva od kojih neki mogu djelovati kao mutageni ili kao aneugeni karcinogeni. Osim toga, razni su izvori zračenja dodatno opterećenje na genom čovjeka.

Od desetak metoda koje se rabe u genotoksikološkim istraživanjima, *in vitro* i *in vivo* mikronukleus tehnike posljednjih su godina naše primjenu kako u bazičnim tako i u kliničkim i farmakološkim istraživanjima. Prednost *in vitro* i *in vivo* mikronukleus tehnika je da istodobno pružaju podatke o klastogenom i aneugenom djelovanju agenasa. Kako ne zahtijeva kultiviranje stanica, *in vivo* mikronukleus tehnika, iako uvedena nekoliko godina nakon *in vitro* tehnike, zbog svoje jednostavnosti i brzine primjene postaje sve važniji izvor podataka u akutnim i kroničnim genotoksikološkim istraživanjima.

Ključne riječi:

aneugeni karcinogeni, citogenetske metode, mutageni karcinogeni

Organizam čovjeka u današnjem okruženju opterećen je brojnim kemijskim tvarima i različitim oblicima zračenja. Izloženost potencijalnim mutagenima ne odnosi se, na žalost, samo na rizične skupine koje su takvim izvorima izložene na radnim mjestima, već na cijelo čovječanstvo, a osobito onaj dio koji je stanovanjem vezan uz gradske sredine. Istraživanja oštećenja genoma genotoksikološkim metodama omogućuju nam procjenu stupnja onečišćenosti okoliša, mehanizama djelovanja mutagena te sposobnosti popravka oštećenja genoma. Uza sve veći broj metoda koje prate promjene na molekularnom nivou razvijaju se i citogenetske metode. U takve metode pripadaju fluorescentna *in situ* hibridizacija metafaznih kromosoma (FISH) (1), metoda izmjene sestrinskih kromatida i metoda komete (2). Navedene metode pružaju nam podatke o prvenstveno klastogenom djelovanju poznatih ili suspektnih karcinogena. Metode kao što su *in vivo* i *in vitro* mikronukleus test govore o karcinogenim agensima koji u manjoj mjeri djeluju na genom klastogeno (strukturno oštećujući kromosome), a u najvećoj mjeri interferiraju s mehanizmom diobenog ciklusa.

Mikronukleus pod svjetlosnim mikroskopom u interfaznoj stanici izgleda poput dodatne stanične jezgre, ali je znatno manji. Opisana su četiri načina nastanka mik-

ronukleusa: gubitak acentričnih fragmenata kromosoma, posljedice različitih tipova oštećenja kromosoma, gubitak cijelog kromosoma kao posljedica oštećenja diobenog vretena ili gubitak funkcionalnosti diobenog vretena te hijazma u paracentričnoj regiji pri čemu će nastati mikronukleus s acentričnim fragmentom.

Apoptoza se često pogrešno navodila kao uzrok nastanka mikronukleusa. Mehanizam apoptoze, tzv. programirane smrti stanice, javlja se kao normalna pojava, ali i kao reakcija na fizikalno ili kemijsko oštećenje stanice i ne mora biti obvezatno genetičke prirode. To je aktivan i o energiji ovisan proces koji može biti potaknut ili zaustavljen te je od ključnog značenja u organogenezi, ali i razvoju neoplazije. Do danas još nije potpuno poznat mehanizam koji pokreće proces apoptoze (3). Suprotno od apoptoze, za stvaranje mikronukleusa nužno je da stanica uđe u diobu. Osim toga apoptotična stanica ne sadržava glavnu jezgru s nekoliko manjih jezgrića već grupu piknotičkih jezgrih fragmenata.

Kvantitativna korelacija između kromosomskih aberacija i učestalosti mikronukleusa nije uvijek prisutna jer je opisano da se neki acentrični fragmenti ne odstranjuju putem mikronukleusa, nego neki od njih mogu i opstati u stanici dijeleći se i formirajući mikronukleus u nekoj od sljedećih dioba. Stvaranje mikronukleusa tako ovisi o tipu stanica, mehaničkim karakteristikama stanice te veličini i broju kromosoma.

Postoji mogućnost da su pri uporabi eksperimentalnih modela neke stanice i prije kultiviranja i izlaganja ispitivanom mutagenu sadržavale mikronukleus te da je nemoguće razdvojiti one mikronukleuse koji su nastali diobom u organizmu i one koji su nastali *in vitro* nakon kultiviranja. Međutim postavlja se pitanje je li stanica koja posjeduje mikronukleus uopće sposobna ući u diobu nakon dodavanja mitogena ili će takva stanica ući u proces apoptoze i umrijeti. Bilo bi dobro razviti tehniku koja bi mogla razlučiti mikronukleuse ovisno o njihovu podrijetlu. Uočene razlike između ispitivanja u frekvenciji mikronukleusa mogu se dijelom protumačiti razlikom u sposobnosti da pojedine oštećene stanice pokrenu proces apoptoze. Teorijski gledano frekvencija mikronukleusa može biti to manja što je tendencija oštećenih stanica da uđu u apoptozu veća. Na taj način puno cjelovitija je slika ako je poznat broj stanica s mikronukleusom i stanica u apoptozi. Takvo se razmišljanje može iskoristiti i za procjenu osjetljivosti osoba na ionizirajuće zračenje. U tom slučaju niska učestalost mikronukleusa može govoriti u prilog boljeg mehanizma popravka DNK, ali isto tako i sposobnosti stanica da uđu u apoptozu prije završetka ciklusa dijeljenja. U svakom slučaju povišena učestalost mikronukleusa znak je povećanog rizika karcinogeneze (4).

OPIS METODA

In vitro mikronukleus metoda

Metodu su prvi opisali *Fenech i Morley* 1985. godine (5). Heparinizirani uzorak pune krvi potakne se na diobu fitohemaglutininom u F-10 mediju kojemu je dodano 20% telečeg seruma. Kultura stanica održava se na 37 °C. Nakon 44 sata kultiviranja dodaje se citohalazin B u konačnoj koncentraciji od 3 µg/ml i nastavlja se kultiviranje do 72. sata kada se prekida centrifugiranjem i fiksacijom u metanol octenoj kiselini. Analiziraju se samo binuklearni limfociti sa sačuvanom membranom i citoplazmom.

Uobičajena je analiza 500 ili 1000 binuklearnih limfocita. Mikronukleus se definira kao jezgrića koja nije manja od 1/6 glavne jezgre niti veća od 1/3 glavne jezgre.

In vivo mikronukleus metoda

Metodu za analizu retikulocita u perifernoj krvi opisao je *Hayashi* 1990. godine (6). Količina od 10 μ l vodene otopine akridin oranža (1 mg/ml) jednoliko se premaže preko predmetnog stakalca. Uzorak od 5 μ l periferne krvi bez dodavanja antikoagulanasa odmah se nakon vađenja stavi na stakalce prekriveno akridin oranžom i pokrije pokrovnicom 24 x 40 mm. Ovakvi se preparati analiziraju pod fluorescentnim mikroskopom. Učestalost mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi zasniva se na analizi 1000 ili više retikulocita po ispitaniku ili životinji. Za analizu slike rabi se kombinacija plavog (v. d. 490 nm) i žutonarančastog filtra (v. d. 515 nm). Analizirane stanice moraju biti neoštećene. Jezgre i mikronukleusi fluoresciraju žuto, a retikulum ima snažan crveni sjaj. Retikulociti se mogu podijeliti u 4 grupe (tip I, II, III i IV) ovisno o stupnju zrelosti, tj. količini crveno fluorescirajućeg retikuluma (7). Retikulociti tipa I, II, III broje se za miša, a retikulociti tipa I i II za štakora. Preporuča se da se preparati analiziraju što prije, ali se mogu sačuvati i nekoliko dana u vlažnoj sredini u hladnjaku.

PROCJENA SADRŽAJA MIKRONUKLEUSA

Kako je mikronukleus rezultat kromosomskih lomova ali i oštećenja diobenog vretena, sama kvantifikacija mikronukleusa ne govori nam dovoljno o mehanizmima koji su doveli do njihova nastanka. Klasični način određivanja sadržaja mikronukleusa jest mjerenje količine DNK i veličine mikronukleusa. Određivanje tipa agensa i sadržaja mikronukleusa na osnovi izmjere veličine mikronukleusa u *in vitro* tehnici (8–10) zasniva se na istraživanjima u kojima se ustanovilo da su mikronukleusi s većom površinom najčešće nastali djelovanjem aneugena te sadržavaju cijele kromosome, dok su mikronukleusi nastali djelovanjem klastogena manje površine. Takva su mjerenja mogla dovesti do grešaka jer su veliki mikronukleusi mogli sadržavati nekoliko acentričnih fragmenata, dok su neki manji mogli sadržavati manji kromosom. Za procjenu sadržaja mikronukleusa isto tako rabilo se C-pruganje (11, 12).

Sredinom 1980-ih počelo se s uporabom antitijela pacijenata oboljelih od sklerodermije (CREST, skraćeno od *calcinosis – Raynaud's phenomenon – esophageal dysmobility – sclerodactility – telangiectasia syndrome*), koja prepoznaju centromerni kinetohorni protein (13, 14). Prednosti CREST metode su niska cijena, brzina i lakoća postupka, mogućnost uporabe na svim modelima u sisavaca, dobro sačuvana morfologija stanice i kromatina. Uz pomoć imunofluorescentnih metoda za dokazivanje prisutnosti kinetohora analiza sadržaja mikronukleusa postala je egzaktnija, ali je primijećeno da pouzdanost metode ovisi i o mogućem odvajanju kinetohora od centromere čime se dobivaju lažno negativni rezultati (15–17). Naime, CREST metodom može se lažno obojiti mikronukleus s acentričnim fragmentom u slučaju kada je ispitivana tvar npr. mitomicin C ili kofein koji su u stanju izazvati odvajanje epitopa kinetohora (18, 19). Dodatna manjkavost metode je da serumski različitih pacijenata koji se rabe kao izvor antitijela mogu pokazivati razlike u reakciji pa time i intenzitetu obojenja.

Sličan je pristup ostvaren uporabom FISH tehnike s centromera specifičnom alfa satelitskom probom čime se obilježava centromerna DNK u mikronukleusu. Ova se metoda u posljednje vrijeme rabi za razna tkiva kao što su limfociti, eritrociti, spermatozoidi, stanice usne šupljine, urotelne stanice, kao i trajne stanične linije i maligne stanice (18, 20–24).

Hibridizacija DNK pancentromernim probama nešto je složenija i skuplja metodologija, ali je specifična i daje puno više podataka. Jednako tako mogu se iskoristiti i probe za čitave kromosome, uobičajene za analize stabilnih translokacija.

In vitro mikronukleus metode i *in situ* hibridizacije daju višestruke mogućnosti analize kao npr.: analize aneuploidije za potrebe genetičke toksikologije u *in vitro* modelima; praćenje aneuploidije kod populacije izložene fizikalnim i kemijskim mutagenima; praćenje osoba koje imaju spontano povećan broj mikronukleusa i usporedba tih rezultata sa pojavom karcinoma i djece s aneuploidijom; određivanje vrsta životinja koje pokazuju posebnu osjetljivost prema tvarima što izazivaju oštećenja diobenog vretena.

Nedostatak je, međutim, FISH metode da je metodološki zahtjevnija i skuplja od CREST metode te da tijekom nužne denaturacije može doći do oštećenja morfologije stanice.

In vitro mikronukleus tehnika je pouzdana metoda. Upotreba različitih medija za kulturu stanica ne utječe na rezultat. Jednako tako ne postoji razlika u rezultatima metode u odnosu na godišnje doba. Kod čovjeka razlika je ustanovljena po dobnim skupinama za svaku dekadu u periodu od 20 do 80 godina života (25).

Za potrebe ujednačavanja metodologije i stvaranja baze podataka pokrenuta je suradnja znanstvenika iz cijelog svijeta koji su se ujedinili u zajedničkom projektu Human Micronucleus Project (HUMN) koji je počeo 1997. godine. Sve pojedinosti i dosadašnji rezultati ovog projekta dostupni su na Internetu.

Uspoređujući opisanu *in vitro* metodu s *in vivo* metodom, mogu se iznijeti ove prednosti i manjkavosti *in vivo* metode:

Prednosti

- ❑ S obzirom na to da je za metodu potrebno malo krvi, uzorci se mogu višekratno uzimati od iste životinje. Time se eliminira potreba za negativnom kontrolom te se smanjuje broj životinja potrebnih za pokuse.
- ❑ Priprema uzoraka i mikroskopiranje su jednostavniji. Stanice su u perifernoj krvi jednoliko raspoređene, a većina stanica su eritrociti. Eritrocite je ovom metodom jednostavnije prepoznati nego iz koštane srži.
- ❑ Upotreba stakalaca prevučениh akridin oranžom daje značajnije bolje obojenje retikuluma nego dosadašnjim načinom bojenja (26).
- ❑ Broj mikronukleusa u retikulocitima je stabilan kod kontrolnih životinja i uklapa se u binominalnu distribuciju.
- ❑ Ova se metoda može rabiti u vrijeme toksikoloških pokusa za potrebe drugih akutnih ili kroničnih metoda jer ne ometa tijek pokusa. U kroničnim pokusima ipak je važno provjeriti funkciju slezene.
- ❑ U procjeni *in vitro* metoda za određivanje karcinogenosti kemijskih tvari koje se rabe u genotoksičnim istraživanjima osjetljivost Amsova testa i metode kromosomskih aberacija bila je oko 50%, izmjena sestrinskih kromatida 70% (27, 28), a za *in vivo* mikronukleus tehniku 60% (29).

Nedostaci in vivo mikronukleus metode

- Preparati se ne mogu arhivirati na dulje vrijeme.
- Način na koji spojevi koji se istražuju ovom metodom mogu zakočiti proliferaciju eritropoetskih stanica još je u fazi istraživanja. *Iwakura* je 1992. godine (30) predložio da odnos retikulocita tipa I s ukupnim brojem analiziranih retikulocita može poslužiti kao koristan pokazatelj citotoksičnosti ispitivanog spoja.

AUTOMATIZACIJA METODA

Kako bi se mogli razlučiti klastogeni od aneugena u *in vivo* metodi razvijena je metoda protočne citometrije za kvantificiranje retikulocita i mikronukleusa periferne krvi miša. Ova metoda za bojenje rabi antiCD7 1 kako bi se razlikovali retikulociti te propidium iodid za bojenje nukleinskih kiselina kako bi se razlikovali eritrociti s mikronukleusima i bez njih. Kako se ovdje radi o automatskom mjerenju, moguće je analizirati i 10000 stanica po uzorku. Razlikovanje aneugena od klastogena postiže se mjerenjem količine DNK u mikronukleusima (31).

Ovakvom automatizacijom mogu se izbjeći uvijek prisutne interindividualne razlike u rezultatima istraživača zbog neizbježne subjektivnosti u procjeni slike. Time je ne samo omogućena objektivizacija već i analiza neusporedivo većeg broja stanica čime se povećava osjetljivost metode.

Treba naglasiti da je zbog grafički manje zahtjevnosti automatska analiza mikronukleusa bila puno lakši izazov nego automatiziranje kromosomskih aberacija i metode izmjene sestrinskih kromatida bilo protočnom citometrijom ili kompjutoriziranom analizom slike.

ZAKLJUČNA RAZMATRANJA

U zaključku možemo reći da je *in vitro* mikronukleus tehnika u trenutku kada se pojavila bila ocjenjena kao metoda koja će se rabiti za potrebe preliminarnog određivanja stupnja oštećenja genoma u sisavaca i nije se doimala informativnom. Međutim, u vrlo kratkom roku njezino se značenje pokazalo ponajprije u prikazivanju nemutagenog djelovanja fizikalnih i kemijskih agenasa, tj. u istraživanju i dokazivanju prisutnosti aneugeničnih mehanizama.

Naime, važnost nepravilnog broja kromosoma u stanici vidljiva je iz činjenice da je povećanje ili smanjenje broja mikronukleusa izazvanog aneuploidijom ili gubitak dijela kromosoma za vrijeme mitoze ili mejoze uvijek uključen u nastanak genetičkih bolesti. *Hernandez i suradnici* su 1990. godine (32) ustanovili da je za čak 10,8% malformacija opisanih prilikom rođenja odgovorna aneuploidija, kao i za 6% prenatalnih smrti (33).

Jednako tako pokazalo se da se mikronukleus test uspješno može iskoristiti i u biljnim modelima. Takva su istraživanja od velike važnosti za potrebe analize onečišćenja tla teškim metalima (34).

Razvijanjem *in vivo* mikronukleus metode pojavile su se dodatne mogućnosti u analizi procesa u koštanoj srži uporabom periferne krvi kao uzorka, što je u velikoj mjeri povisilo stupanj egzaktnosti ispitivanja, ali i pojednostavnilo i ubrzalo analizu izostavljajući kulturu stanica i time dodatno smajujući trošak analize. Pred nama je razdoblje u kojem će se obje metode nadopunjavati drugim genotoksičnim tehnikama. Nadajmo se da će razvoj genotoksičnih metoda biti praćen primjenom njihovih rezultata radi smanjenja opterećenosti okoliša potencijalnim karcinogenima te da će se jednakim ritmom razvijati metode citogenetičke dijagnostike i liječenja.

LITERATURA

1. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494–7.
2. Fučić A. Comet assay: a new approach in genotoxicological research. *Arh hig rada toksikol* 1997;48:413–9.
3. Kerr JFR, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: an histological perspective. U: Tomei LD, Cope FO, ur. *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991;5–29.
4. Scott D, Barber JBP, Levine EL, Burrell W, Roberts SA. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases amongst breast cancer patients: a test for predisposition. *Br J Cancer* 1998;77:614–20.
5. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147:29–36.
6. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocyte using acridine orange coated slides. *Mutat Res* 1990;245:245–9.
7. Vander JB, Harris CA, Ellis SR. Reticulocyte counts by means of fluorescence microscopy. *J Lab Clin Med* 1963;62:132–40.
8. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991;18:277–91.
9. Garaj-Vrhovac V, Fučić A, Horvat Đ. Comparison of chromosome aberration and micronucleus induction in human lymphocytes after occupational exposure to vinyl chloride monomer and microwave radiation. *Period biol* 1990;92:411–6.
10. Vanderkerken K, Vanparys Ph, Vershave L, Kürsch-Volders M. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis* 1989;4:6–11.
11. Banduhn N, Obe G. Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, C mitoses polyploides and micronuclei. *Mutat Res* 1985;156:199–218.
12. Faroqi Z, Darroudi F, Natarajan AT. The use of fluorescein *in situ* hybridization for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* 1997;8:329–34.
13. Frackowiak S, Labidi B, Hernandez-Verdun D, Bouteille M. Preservation of chromosome integrity during micronucleation induced by colchicine in Ptk1 cells. *Chromosoma* 1986;94:468–74.
14. Vig BK, Swearngin SE. Sequence of centromere separation. Kinetochore formation in induced laggards and micronuclei. *Mutagenesis* 1986;1:461–5.

15. *Eastmond DA, Tucker JD.* Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 1989;13:34–43.
16. *Fenech M, Morley AA.* Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis* 1989;4:98–104.
17. *Vig BK, Sternes KL.* Centromeres without kinetochore proteins, Another mechanism for origin of aneuploidy in neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;51:269–72.
18. *Miller B, Nusse M.* Analysis of micronuclei induced by 2-chlorobenzylidene malonitrile (CS) using fluorescence in situ hybridization with telomeric and centromeric DNA probes and flow cytometry. *Mutagenesis* 1993;8:35–41.
19. *Zinkowski RP, McCune SL, Balczon RD.* The centromere and aneuploidy: I. Caffeine induced detachment and fragmentation of kinetochore of mammalian chromosomes. (U: Resnick M, Vig B, ur. *Mechanisms of Chromosomes Distribution and Aneuploidy.* New York: Wiley and Liss, 1989:43–60.
20. *Kirchner S, Stopper H, Papp T, et al.* Cytogenetic changes in primary, immortalized and malignant mammalian cells. *Toxicol Lett* 1993;67:283–95.
21. *Chen H, Rupa DS, Tomar R, et al.* Chromosomal loss and breakage in mouse bone marrow and spleen cells exposed to benzene *in vivo*. *Cancer Res* 1994;54:3533–9.
22. *Afshari AJ, McGregor PW, Allen JW, Fuscoe JC.* Centromere analysis of micronuclei induced by 2-aminoanthraquinone in cultured mouse splenocytes using both a gamma-satellite DNA probe and antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 1994;24:96–102.
23. *Hayashi M, Maki Paakkanen J, Tanabe H.* Isolation of micronuclei from mouse blood and fluorescence in situ hybridization with a mouse centromeric DNA probe. *Mutat Res* 1994;307:245–51
24. *Van Hummelen P, Elhajouji A, Kirsch-Volders M.* Clastogenic and aneugenic effects of three benzimidazole derivatives in the *in vitro* micronucleus test using human lymphocytes. *Mutagenesis* 1995;10:23–9.
25. *Fenech M.* Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes – a biomarker for DNA damage in human population. *Mutat Res* 1998;404:155–65.
26. *MacGregor JT, Wehr CM, Gould DH.* Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test *Environ Mol Mutagen* 1980;2:509–14.
27. *Tennant RW, Margolin BH, Shelby MD, et al.* Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays. *Science* 1987;236:933–41.
28. *Zeiger E, Haseman JK, Shelby MD, et al.* Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1990;16(suppl 18):1–14.
29. *Morita T, Asano N, Awogi T, et al.* Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Group 1, 2A, 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS. *Mutat Res* 1997;389:3–122.
30. *Iwakura K, Tamura H, Matsumoto A, et al.* The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes by acridine orange supravital staining with 1-D- arabinofuranosylcytosine. *Mutat Res* 1992;278:131–7.
31. *Torous D, Dertinger SD, Hall NE, Tometsko CR.* An automated method for discriminating aneugen vs clastogen induced micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 1998;3:340–4.
32. *Hernandez A, Reynoso MC, Soto F, et al.* Aneuploidies, chromosome aberrations and dominant gene mutations detected in 113913 consecutive newborn children. *Mutat Res* 1990;232:23–9.
33. *Sankaranarayanan K.* The role of non-disjunction in aneuploidy in man: an overview, *Mutat Res* 1979;61:1–28.
34. *Stienkellner H, Mun-Sik K, Helma C, et al.* Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassay. *Environ Mol Mutagen* 1998;31:183–91.

*Summary***IN VITRO AND IN VIVO MICRONUCLEUS TESTS IN GENOTOXICOLOGICAL RESEARCH**

Working and living environment today is an unpredictable mixture of different chemical substances. Some of these chemicals are mutagenic carcinogens and others are aneugenic carcinogens. An additional burden to the human genome is the exposure to several kinds of radiations. Among a dozen genotoxicological methods in use *in vitro* and *in vivo*, the micronucleus assay has found application in the basic research, clinical research, and pharmacological studies. The advantage of *in vivo* and *in vitro* micronucleus assays is in the fact that they provide data on both clastogenic and aneugenic action of agents. Although several years behind the *in vitro* technique, the *in vivo* micronucleus assay has swiftly developed into a significant source of data in acute and chronic genotoxic investigations, as it does not require cell culture.

Key words:

aneugenic carcinogens, cytogenetic methods, mutagenic carcinogens

Requests for reprints:

Dr. sc. Aleksandra Fučić
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, p.p. 291, 10001 Zagreb
E-mail: afucic@imi.hr